

DR-53

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОМБИНАТОРНЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК

О. С. Волкова^{1,2}, С. А. Лапа¹, А. В. Чудинов¹

¹ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32

²МИРЭА – Российский технологический университет,
119571, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86

Аптамеры – одноцепочечные ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, функциональные аналоги моноклональных антител. Подбор аптамера к мишени осуществляется с помощью метода SELEX (от англ. *S*ystematic *E*volution of *L*igands by *E*xponential *E*nrichment – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

Для отбора аптамеров используют комбинаторные библиотеки, которые содержат переменный участок с перебором всех четырех нуклеотидов. Введение модификаций позволяет получать аптамеры с новыми свойствами. В настоящий момент для получения модифицированных аптамеров чаще всего используют реакцию удлинения праймера (primer extension, PEX). Недостатком этого метода является более низкий выход целевых продуктов по сравнению с ПЦР. В настоящей работе продемонстрировано, что метод ПЦР при условии адаптации и оптимизации (температурно-временной режим, концентрации компонентов) пригоден для обогащения модифицированных комбинаторных библиотек.

Проводили SELEX с использованием комбинаторной библиотеки с последовательностью [1]. В качестве модифицированного производного использовали 2'-дезоксиридин-5'-трифосфат, модифицированный по 5-положению фенилпропионовой кислотой. Для разделения цепей ДНК-библиотеки использовали биотинилированный праймер и магнитные стрептавидиновые частицы. Для проверки обогащения комбинаторной библиотеки использовали анализ кривых плавления (рис. 1). Анализ соотношения высот низкотемпературного (первого) и высокотемпературного (второго) пиков для образцов после 3 и 6 циклов свидетельствует о процессе обогащения (накопления специфичных к мишени последовательностей) в результате SELEX. Таким образом, оптимизированный метод ПЦР подходит для получения модифицированных комбинаторных библиотек. Было проведено клонирование образцов в *E.coli* и выделение индивидуальных последовательностей для дальнейшего секвенирования.

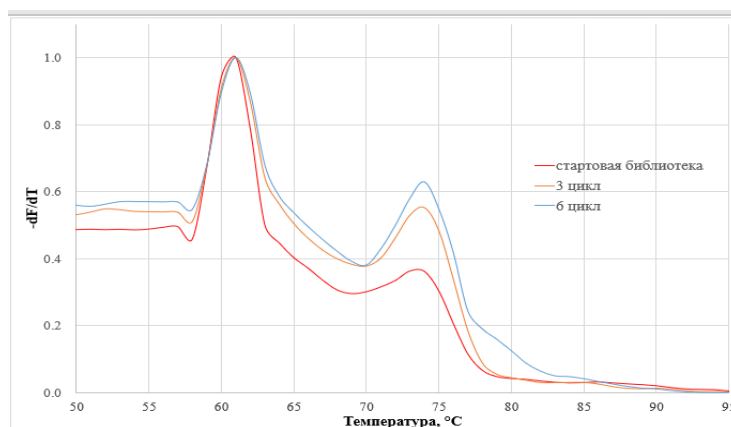


Рисунок 1 – Кривые плавления продуктов амплификации.

Библиографический список

1. Лапа С.А. Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей / Лапа С.А., Ромашова К.С., Шершов В.Е. и др. // Молекулярная биология. – 2018. – т.52, № 6. – с. 984–996.